

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

25331

**BÜYÜMEYE BAĞLI OLARAK
GLİKOPROTEİNLERİN İFADESİ**

Ali ATEŞ
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KONYA - 1992

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BÜYÜMEYE BAĞLI OLARAK GLİKOPROTEİNLERİN İFADESİ

Ali ATEŞ

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

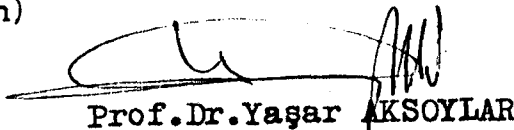
Bu tez 02.07.1992 . tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
kabül edilmiştir.



Prof.Dr.Hasan BAĞCI
(Danışman)



Doç.Dr.Zekiye SULUDERE
Üye


Prof.Dr.Yaşar AKSOYLAR

ABSTRAKT

Doktora Tezi

BÜYÜMEYE BAĞLI OLARAK GLİKOPROTEİNLERİN İFADESİ

Ali ATEŞ

Selçuk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Hasan BAĞCI

1992, Sayfa: 45

Jüri: Prof.Dr. Hasan BAĞCI
Prof.Dr. M.Yaşar AKSOYLAR
Doç.Dr. Zekiye SULUDERE

Farklı gelişme devresinde bulunan Swiss faresi 3T3 fibroblastlarının glikoprotein profilleri çalışıldı. Çoğalan ve quiescent fibroblast kültürleri, % 0.5 iyonik olmayan deterjan Triton Y - 100 ile muamele edildikten sonra, deterjana dirençli materyaller poliakrilamid gel elektroforezi ile ayrıştırıldı. Poliakrilamid gel elektroforezi ile ayrıştırılmış materyal, elektroforetik olarak nitroselüloz membrana transfer edildi ve blot, peroksidaz bağlı, Conconavalin A (Con - A), wheat germ aglutinin (WGA), Ricinus communis aglutinin (RCA), Lotus tetragonolobus aglutinin (LTA) ve Ulex europaeus (UEA) aglutininini gibi lektinlerle boyanarak, glikoproteinler görünür hale getirildi.

Con - A, her iki durumdaki hücrelerde molekül ağırlığı 220 - kD, 175 - kD, 145 - kD, 85 - kD ve 70 - kD olan glikoproteinleri boyadı. Quiescent hücrelerdeki 145 - kD glikoprotein, çoğalan hücrelerde farkedilmedi. Çoğalan hücrelerdeki 85 - kD ve 70 - kD Con - A reaktif bantlar, quiescent hücrelerde daha zayıf olarak boyandı. WGA'nın quiescent hücrelerde farketmediği 175 - kD band, çoğalan hücrelerde bulunmamaktadır. Çoğalan hücrelerde en göze çarpan WGA reaktif bantlar 85 - kD ve 70 - kD iken bu bantların WGA reaktivitesi quiescent hücrelerde önemli derecede azalmıştır. Çoğalan hücrelerdeki 68 - kD RCA reaktif band quiescent hücrelerde farkedilmedi.

Anahtar kelimeler: glikoprotein, lektin, 3T3 fibroblast, hücre gelişmesi.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

GROWTH - RELATED EXPRESSION OF GLYCOPROTEINS

Ali ATEŞ

Selçuk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Hasan BAĞCI

1992, Page:45

Jury: Prof.Dr. Hasan BAĞCI

Prof.Dr. M.Yaşar AKSOYLAR

Assoc Prof.Dr.Zekiye SULUDERE

Glycoprotein profiles of Swiss mouse 3T3 fibroblast at different stages of growth were studied. After treatment of cultured growing and quiescent fibroblasts with 0.5 % non - ionic detergent Triton X - 100, the detergent - insoluble materials were separated by polyacrylamide gel electrophoresis. The separated material was transferred electrophoretically onto nitrocellulose membrane and the glycoproteins of the cells visualized by staining the blot with peroxidase - conjugated lectins, such as, Concanavalin A (Con -A), wheat germ agglutinin (WGA), Ricinus communis agglutinin (RCA), Lotus tetragonolobus agglutinin and Ulex europaeus agglutinin (UEA).

Con - A revealed several glycoprotein bands in both state cells with molecular weights of 220 - kD, 175 - kD, 145 - kD, 85 - kD and 70 - kD. The 145 - kD glycoprotein in quiescent cells was not detected in growing cells. The 85 - kD and 70 - kD Con - A binding glycoproteins in growing cells, stained very faintly in quiescent cells. WGA recognized a band with a molecular weight of around 175 - kD in quiescent cells which is absent in growing cells. While the 85 - kD and 70 - kD bands are the striking WGA - binding glycoproteins in growing cells, their WGA sensitivity greatly reduced in quiescent cells. The 68 - kD RCA - binding glycoprotein in growing cells, was not detected in quiescent cells.

Key words: glycoprotein, lectin, 3T3 fibroblast, cell growth.

TEŐEKKÜR

Bu alıőmanın hazırlanmasında, her türlü yardımlarını gördüğüm, Orta Doęu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünden değerli hocam sayın Prof. Dr. Hasan BAĞCI'ya, Essex Üniversitesi Biyoloji Bölümünden (İngiltere) Dr. K. Minnie O'FARREL'a ve fotoğrafları hazırlayan, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi fotoğrafçısı Bekir CEYLAN' a içtenlikle teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Lektinler	4
2.2. Lektinlerin Kullanım Alanları	4
2.3. Bitkilerde Lektinlerin Görevleri	7
2.4. Glikoproteinlerin Fonksiyonları	8
3. MATERYAL ve METOT	11
3.1. Hücre ve Doku Kültürü	11
3.2. Çoğalma Eğrisi	11
3.3. Hücre Ekstraktının Hazırlanması	12
3.4. Hücre Ekstraktlarının Protein Miktarının Belirlenmesi	13
3.5. Poliakrilamid Gel Elektroforezi ve Elektroforetik Transfer	14
3.6. Glikoproteinlerin Lektinlerle Boyanması ...	15
4. DENEY SONUÇLARI	17
4.1. Çoğalma Eğrisi	17
4.2. Con A Blot Analizi	17
4.3. WGA Boyaması	21
4.4. <u>Lotus tetragonolobus</u> Lektini Boyaması	24
4.5. <u>Ricinus communis</u> Aglutinini Boyaması	24
4.6. <u>Ulex europaeus</u> Aglutinini Boyaması	28
5. TARTIŞMA	30
6. KAYNAKLAR	38

1. GİRİŞ

Hücre çoğalmasının kontrolü ile ilgili çalışmalar, bölünmeyen fakat gerekli şartlar sağlandığı zaman çoğalabilen (quiescent) hücrelerle, logaritmik olarak çoğalan hücreler arasında birçok yönden farklılıklar bulunduğunu göstermiştir. Bu farklılıklardan bir tanesi bazı proteinlerin ortadan kaybolması veya yeni proteinlerin ortaya çıkmasıdır (Baserga 1985, Denhardt ve ark. 1986).

Verma ve ark. (1988) tarafından maya hücrelerinde pll8 olarak isimlendirilen bir glikoprotein tanımlanmıştır. Bu glikoprotein sentezi çoğalan hücrelerde durdurulur. Fakat besin yetersizliğinde veya yumuşak sıcak şokunda sentezi 8 - 12 kat artar. Bu duruma zıt olarak 36 000 D proteinin çoğalan hücrelerde mevcut, çoğalmayan hücrelerde ise bulunmadığı belirlendi (Mathews ve ark. 1984). Statin quiescent insan fibroblastlarının çekirdeğinde bulunan, aynı hücrelerin çoğalan durumda olanlarında ise bulunmayan 57 000 D molekül ağırlığında bir proteindir (Wang 1985). Statin serum stimülasyonundan 12 saat sonra hızlıca kaybolur (Wang ve Lin 1986). 68 kD protein G1 fazında sentezlenir ve yaşama süresi çok kısadır. Bu protein tümör hücrelerinde aşırı miktarda sentezlenir ve stabilize edilir (Croy ve Pardee 1983). Serumla stimüle edilen quiescent hücreler çoğalma dönemine girerken 15 kD, 33 kD, 42 kD ve 57 kD proteinler tercihen sentezlenir (Riddle ve ark. 1979). Transform ve normal hücreler mukayese edildiğinde 35 000 D proteinin normal hücreler tarafından sentezlenmediği,

transform hücreler tarafından ise sentezlendiği tespit edilmiştir (Rollins ve Stiles 1989) .

Bundan önceki çalışmalar, hücre çoğalmasına bağlı olarak hücre yüzeyi glikoproteinlerinin de değişebileceğini göstermiştir. Wu ve ark. (1969) logaritmik olarak çoğalan ve konfluent 3T3 hücreleri arasında glikoprotein kompozisyonu açısından farklılıklar olduğuna işaret etmişlerdir. Baby hamster kidney (BHK) hücreleriyle çalışan Buck ve ark. (1971) logaritmik fazdaki hücrelerin konfluent hücrelerden daha yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinlere sahip olduğunu kaydetmişlerdir. Yavaş gelişen fare fibroblast kültürlerinde, sialik asit miktarı hızlı gelişen kültürlerden daha fazladır (Glick ve ark. 1970).

Fluorescein izotiosiyanat ile işaretlenmiş Wheat germ aglutininini (WGA) ile boyanan 3T3 hücrelerinde, WGA reaktif kısımların profaz hariç mitoz esnasında ortaya çıktığı gösterildi (Fox ve ark. 1971). Normal 3T3 hücreleri 20 µg/ml concanavalin A (Con-A) ile sadece mitozda aglutine olurken, bölünmeden sonra aglutinasyon görülmez. Halbuki aynı miktardaki Con-A ile SV40-3T3 hücreleri G1, S ve G2 fazlarında da aglutine olur, fakat dereceli olarak aglutinasyon azalır (Smets ve Ley 1974).

Bu çalışmaların sonuçlarından görüldüğü gibi hücre glikoproteinleri, transformasyon sonucu değişebildiği gibi çoğalan hücrelerle çoğalmayan hücreler arasında da farklılık göstermektedir. Bu çalışma, lektinlerin spesifik şeker bağlama özelliklerinden faydalanarak, çoğalan ve quiescent durumundaki Swiss faresi normal 3T3 fibroblastların

glikoproteinlerinin işaretlenmesini amaçlamaktadır. Hücre çoğalmasına bağlı olarak glikoprotein değişimlerinin çalışılması, hücre çoğalmasının kontrol mekanizmasının anlaşılabilmesi için DNA sentezi ve hücre bölünmesine neden olan moleküler olayların aydınlatılmasına yardımcı olacaktır. Doku kültürlerinde çoğalan ve çoğalmayan hücrelerin ayırt edilmesine ışık tutacaktır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Lektinler

Lektinler immün kökenli olmayan ve en az iki şeker bağlama grubuna sahip protein veya glikoprotein molekülleri olup, hücreleri aglutine, glikokonjugatları presipite ederler. Glikosidazlar, glikosiltransferazlar, transport proteinleri, glikosilkinazlar ve toksinler birden çok şeker bağlama gruplarına sahip olsalar da lektin olarak gözönüne alınmazlar (Nomencl. Com. Arch. 1981). Agglutinin, phytohemaagglutinin, phytoagglutinin ve protektin gibi terimler, geçmişte lektin terimi yerine kullanılmışlardır (Kocoörek 1986, Goldstein ve ark. 1980, Dixon 1981).

Lektinler, spesifik şeker bağlama özelliklerinden faydalanılarak, karbohidrat ve glikoprotein çalışmaları ile hızla gelişen araştırma sahalarında güçlü vasıtalar olarak kullanım alanı bulmaktadırlar.

2.2. Lektinlerin Kullanım Alanları

Bir glikoprotein olan yumurta ovalbumini alışılmış tekniklerle saflaştırıldıktan sonra Con A kolonundan geçirildiğinde karbohidrat kompozisyonu farklı dört subfraksiyon elde edilmiştir. Alışılmış tekniklerle bu ayırım mümkün olamamıştır (Iwase ve ark. 1981). Benzer şekilde birçok lizozomal enzim Con A Sefaroz kolonu vasıtası ile çalışıldı. B-glukosidaz, lipaz, 5-nükleotidaz ve horseradish peroxidaz gibi membran enzimleri saflaştırıldı.

Ayrıca Con A ya bağlandıktan sonra bu enzimlerin aktif olmaları, bu enzimlerin katalitik bölgelerinden başka bölgeleri ile Con A ya bağlandıklarını göstermektedir (Dulaney 1979).

Kompleks hücre ekstraktlarından glikoproteinlerin ve polisakkaritlerin ayrıştırılmasında, lektin affinite kromotografileri kullanıldı. Örneğin laminin Griffonia simplicifolia B₄ lektininden faydalanılarak saflaştırıldı (Fujita-Yamaguchi ve ark. 1983, Shibata ve ark. 1982).

Lektinlerin önemli kullanım alanlarından birisi de total hücre ekstraktının sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi ile (SDS - PAGE) ayrıştırıldıktan sonra protein ve glikoproteinlerin nitrosellüloz membrana elektroforetik olarak transfer edilmesi ve nitrosellüloz membranın lektinlerle boyanarak glikoproteinlerin tanınmasıdır (Furlan ve ark. 1979, Glass ve ark. 1981, Hawkes ve ark. 1982).

Lektinin spesifik olduğu şekerin ilave edilmesi ile lektin bağlanmasının çözülebilmesi, lektinlerin hücrelerin tanınmasında ve hücre subpopulasyonlarının ayrıştırılmasında kullanılmasına imkan vermiştir. Reisner ve ark. (1980) yer fıstığı aglutinini kullanarak, farelerde prelösemik hücreleri geç devre lösemik hücrelerden ayırt etmişlerdir. Aynı şekilde B ve T lenfositleri soya fasülyesi aglutinini ile ayrıştırıldı. Mikroorganizmaların tanınmasında da lektinler kullanıldı. Örneğin, Neisseria gonorrhoeae, WGA kullanılarak yakinen ilgili bakteriler karışımından tanınabildi (Lis ve Sharon 1986).

Lektinlerin yaygınca uygulama alanı bulduğu başka bir saha da kan gruplarının ayırt edilmesidir. Lotus tetragonolobus ve Ulex europeus lektinleri O grubu eritrositler için spesifiktir. Bu spesifiklik özellikle önemlidir çünkü doğal olarak O grubuna karşı anti-O antikoru mevcut bulunmamaktadır. Bundan başka Vicia graminea'den elde edilen lektin M ve N grup eritrositleri ayırt edebilmektedir (Finne ve ark. 1980).

Hücre yüzeyi glikokonjugatlarının fonksiyonu, biosentezi ve genetiğinin çalışılmasında olduğu kadar glikolipid ve glikoproteinlerin sentezi ile ilgili enzimlerin hücre içi organizasyonunun çalışılmasında lektin - resistant hücreler yeni bir araç olmuştur. Lektin - resistant hücrelerde, yüzey oligosakkaritleri şeker residülerinin ilavesi veya delesyonu ile değişikliğe uğramaktadır (Lis ve Sharon 1986). Ricin - resistant mutantlarda ricinin bağlandığı galaktoz residülerinin miktarı artırılmış, sialik asit tarafından maskelendiği gösterilmiştir (Stanley 1980). WGA - resistant mutantlarda, azalan sialik asit buna karşın artan L-fukoz, mutantın Lotus tetragonolobus lektinine karşı duyarlılığının artmasına neden olur (Finne ve ark. 1982).

Lektin - resistant mutantlar, hücre yüzeyi şekerlerinin biyolojik rolünün ve hücre yüzeyi ile neoplasia arasındaki ilişkinin anlaşılmasına da katkıda bulunmuştur. Hücre membranındaki glikoprotein değişikliklerinin anlaşılabilmesi için kanser araştırmalarında lektin - resistant variantların kullanımına ilgi artmıştır. Bu yönde

Tao ve Burger (1982) WGA - resistant melanoma hücreleri ile yaptıkları çalışmada, variantın metastatik kapasitesinin dramatik bir şekilde azaldığını kaydetmişlerdir.

Günümüzde çok açık bir şekilde kabul edilmektedir ki malignansi ve tümör ilerlemesi hücre membranında, N-asetilgalaktozamin ile galaktoz residülerinin sialisyonu ve asparagin - bağlı glikopeptidlerin normalden farklı olarak dallanması ile pozitif yönde ilgilidir (Dennis 1985).

2. 3. Bitkilerde Lektinlerin Görevleri

Lektinlerin birçok bitki türünde ve farklı organlarında keşfedilmesinden dolayı, bitkilerde temel bir rollerinin olduğuna inanılır. Lektinlerin birçok rollerinin olduğu ileri sürülürse de esas rollerinin bitkilerde savunma yönelik olduğu vurgulanır (Etzler 1986). Örneğin lektin ihtiva eden bitki tohumları yada öteki bitki organları predatörler tarafından yenildiğinde, lektin barsakta serbest bırakılır ve glikoproteinlerle temas eder (Fountain ve ark. 1977).

Bitki dokusu içerisine doğru gelişen mantar hiflerinin gelişmesi enfekte bitki organı tarafından bırakılan lektin tarafından engellenir (Chrispeels ve Raikhel 1991).

Bitkilerde lektinlerin savunma rolü deney sonuçları ile de desteklenmiştir. Jansen ve arkadaşlarının (1976) çalışmaları phytohaemagglutinin (PHA) bazı kınkanatlı böceklerle toksik olduğunu, Gatehouse ve arkadaşları (1984) PHA'nın Callosobruchus maculatus larvalarının gelişmesini

inhibe ettiğini göstermişlerdir. WGA'nın Trichoderma viride spor çimlenmesini ve hif gelişimini engellediği de Mirelman ve arkadaşları (1975) tarafından rapor edilmiştir.

2. 4. Glikoproteinlerin Fonksiyonları

Glikoproteinler hayatın bütün formlarında mevcuttur. Uzun zamandır biyolojik bir rollerinin olmadığı göz önüne alındı ise de son çalışmalar, glikoproteinlerin hücrede çok önemli fonksiyonlarının olduğunu göstermiştir. Fukosidaz ile muamele edilmiş rat lenfositlerinin esas göç yerleri olan dalak yerine, karaciğere göç ettikleri tesbit edilmiştir. Bu hedef değiştirmenin nedeni, lenfosit yüzey fukozunun dalak hücre membranlarındaki reseptörler için bir tanıma sinyali olduğu şeklinde açıklanmıştır (Montreuil 1980).

Araştırmacıların glikoproteinlere esas ilgisi hücrelerin lektinlerle aglütinasyon çalışmalarından kaynaklanır. Polyoma virüsü ile transform BHK fibroblastlarının, artan N - asetilglukozamin ve sialik asit miktarından dolayı WGA ile aglutine olduğu, buna karşın normal hücrelerin aglutine olmadığını gözledi (Burger ve Goldberg 1967, Burger 1969). Aynı hücreleri kullanarak Inbar ve Sachs (1969) transform hücrelerin Con A ile aglutine olduğu fakat normal hücrelerin aglutine olmadığını tespit etmişlerdir.

Çağdaş hücre biyolojisinin önemli konularından birisini, glikoproteinlerin karbohidrat kısımlarının fonksiyonları teşkil etmektedir. Bu yönde yapılan çalışmalardan

önemli bilgiler kazanılmıştır. Fare plazma hücrelerinde immünooglobulin A ve E nin granüllü endoplazmik retikulumda, mobilitenin bozulmasından dolayı biriktiği ve dilasyona sebep olduğu belirtilmiştir. Mobilite bozukluğunun nedeni olarak glikolizasyonun önlenmesi gösterilmiştir (Hickman ve ark. 1977). Olden ve arkadaşları (1982) fibroblast fibronektininin, hücre kültürü tunicamycin ile muamele edildiğinde hızlı bir şekilde parçalanmaya uğradığını rapor etmişlerdir. Plasenta fibronektininin proteinalara karşı daha dayanıklı olması da karbohidrat kısmının fazlalığına yüklenir (Zhu ve ark. 1984). Aynı şekilde invertaz, deoksiribonükleaz ve penisilin nükleaz P 1'in karbohidrat kısımlarının enzimlerle uzaklaştırılması, bunların proteazlara olan duyarlılığını artırmıştır (Chu ve ark. 1978).

Fare 3T3 fibroblastları (Duksin ve Bornstein 1977) ve civciv embriyo fibroblastları (Olden ve ark. 1978) yapılan çalışmalarda, tunicamycin ile yeni sentezlenmiş hücre yüzeyi glikoproteinlerinin glikosilasyonu inhibe edildiğinde bu proteinlerin sekresyonu azalmıştır.

Bazı proteinlerin granüllü endoplazmik retikulumdan Golgi aparatına taşınmasında N - bağlı oligosakkaritlere ihtiyaç duyulduğu ileri sürülmüştür. Hücrelerin glukosidaz I ve II'nin spesifik inhibitörü olan 1 - deoxynojirimycin, polipeptid zincirine N - bağlı oligosakkaritlerin ilavesini inhibe eden ve bir antibiotik olan tunicamycin, Golgi mannosidaz 1'i inhibe eden swainsonine ile muamelesi deneyleri sonuçları bir çok eksport proteinlerinin sekresyon oranını azalttığını göstermiştir (Lodish ve Kong 1984, Schwarz ve Datema 1984).

Gelişme biyolojisinin çok önemli problemlerinden birisi embryonik hücrelerin göçünün mekanizmasının aydınlatılmasıdır. Erken embryogenezde glikoproteinler uyarı moleküllerine cevapta, hücrelerin yapışması, göçmesi ve tanınmasında rol oynamaktadır. Embryonik gelişme ve farklılaşma ile proteinlerin glikosilasyonu arasındaki ilişkiyle ilgili çalışmalar, glikosilasyonun inhibe edilmesi ile embryonik gelişme ve farklılaşmanın durduğunu göstermiştir.

Tunicamycin uygulaması, deniz kestanesinin gelişmesini, mezenşim hücrelerinin yoğun olarak hareket ettiği gastrulasyon devresinde durdurur. Tunicamycin iki hayatluların ve memelilerin embryogenezini de blastula safhasında inhibe eder (Schwarz ve Datema 1984, Olden ve ark.1982).

Glikoproteinlerin oligosakkarit kısımları, glikoproteinlerin hücre içerisinde nereye gideceğini belirleyen bir sinyal olarak görev yapar. Golgi ve lizozom veziküllerinde, hücre yüzeyinde ve endoplazmik retikulumda bulunan lektinler, glikoproteinlerin karbohidrat kısımları ile etkileşirler. Örneğin, lizozomal asit hidrolazların endoplazmik retikulundan lizozoma gitmesi, bu enzimlerin karbohidrat kısımlarının ilgili lektinlerle etkileşmesi sonucu gerçekleşir (Olden ve ark. 1982).

3. MATERYAL ve METOT

3. 1. Hücre ve Doku Kültürü

Bu çalışmada Swiss faresi normal 3T3 fibroblast hücreleri (Todaro ve Green 1963) kullanıldı. Hücreler Imperial Cancer Research Fund'dan (ICRF), (Londra) satın alındı. Rutin olarak laboratuvarında, 90 mm plastik Petri kaplarında (Nunc, Denmark) yetiştirildi. Medium olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. Medium, % 0.011 g sodyum pruvat, % 0.6 mg hipoksantin, %6.25 mg penisilin, % 6.75 mg streptomisin, % 6.8 ug B12 vitamini ve % 10 (v/v) FCS (foetal calf serumu) ile desteklendi.

Kültüre her Petri kabına 100 000 hücre ekilerek başlandı. Hücreleri ihtiva eden Petri kapları 37 C derecede, % 7'lik CO₂ içeren hava ile ve nemlendirilmiş bir inkübatörde, inkübe edilerek hücreler yetiştirildi. Stok kültür her 3 - 4 günde bir pasaj yapıldı. Kullanılan kültürlerde mikoplasma kontaminasyonu olup olmadığı kontrol edildi. Yeni kültüre dondurulmuş ve sıvı azot içerisinde saklanan stok kültürden başlandı (De Asua ve ark. 1977).

Hücre kültüründe kullanılan bütün kimyasallar doku kültürü derecesinde olup Sigmadan satın alınmıştır. FCS ise ICRF'den (Londra) satın alınmıştır.

3. 2. Çoğalma Eğrisi

Çoğalma eğrisi için hücreler 35 mm lik Petri

kaplarına (Nunc, Denmark) 30 000 başlangıç hücre sayısı ile ekildi. Her gün aynı saatlerde, en az iki Petri kabındaki hücreler hematositometrede sayılarak ortalaması alındı.

Hücrelerin sayımı için, ortam Petri kabından aspire edildi. Hücreler iki defa PBS (phosphat buffered saline) ile yıkandı. % 0.25 lik tripsin (Difco) solüsyonunun 2 mililitresi, % 0.02 lik EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) çözeltisinin 8 mililitresine ilave edildi. 1 ml tripsin, EDTA karışımı hücrelere ilave edilerek hemen uzaklaştırıldı. 0.5 ml karışım ile hücreler 37 C derecede 3 dakika inkübe edildi. Hücrelerin Petri kabından ayrıldığı mikroskop altında kontrol edildikten sonra 1.5 ml çoğalma ortamı Petri kabına ilave edildi ve hemositometre ile sayım yapıldı. Homojen dağılmamadan kaynaklanacak hatayı minimuma indirmek için, bütün karelerde sayım yapıldı.

3. 3. Hücre Ekstraktının Hazırlanması

Total hücre ekstraktları hücrelerin 90 milimetrelik Petri kaplarına ekilmelerinin 2. ve 7. günleri sonunda ayrı ayrı hazırlandı. Çoğalma ortamı aspire edildikten sonra hücreler bir defa ılık, iki defa soğuk PBS ile yıkandı. Hücreleri yıkamak için kullanılan PBS, 1 mM PMSF (fenil metil sülfonil fluroid) ile desteklendi. İstenen miktar % 5 (w/v) elektroforez numune tamponu ilave edilerek, hücreler temiz bir kauçuk ile Petri kabından kazındı. Total ekstrakt Eppendorf tüplerine transfer edildi. Önce 23 G sonra 25 G şırınga uçlarından geçirilerek 3 dakika kaynar su banyo -

sunda bekletildi. Ekstrakt yeni Eppendorf tüplere aktarılarak, kullanılıncaya kadar -20 C derecede saklandı.

Hücrelerin Triton X - 100 ekstraktları Tarone ve ark. (1984) metoduna göre yapıldı. Hücrelerin 90 milimetrelilik Petri kaplarına ekilmelerinin 2. ve 7. günlerinde, çoğalma ortamı uzaklaştırıldıktan sonra bir defa ılık, iki defa soğuk 1 mM PMSF ile desteklenmiş PBS ile yıkandı. Her Petri kabına 10 ml Triton X - 100 tamponu ilave edildi. Triton X - 100 tamponu, 10 mM Tris - HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, % 0.5 Triton X - 100 ile hazırlandı ve 1 mM PMSF ile desteklendi. Triton X - 100 tamponu ile hücreler 20 dakika süreyle 4 C derecede inkübe edildi. İnkübasyon sırasında Petri kapları 3 defa yavaşça çalkalandı. Hücreler 2 defa soğuk ve taze Triton X - 100 tamponu ile durulandıktan sonra total ekstrakta olduğu gibi ekstre edildi.

3. 4. Hücre Ekstraktlarının Protein Miktarının Belirlenmesi

Ekstraktların protein miktarının belirlenmesi Schaffner ve Weissmann (1973) metoduna göre yapıldı. % 5 SDS (sodyum dodesil sülfat) numune tamponu içerisinde 10 mg/ml BSA (bovine serum albumin, Sigma, derece V) stok solusyonu hazırlandı. Bu standart stoktan, standart eğri için ayrı ayrı olmak üzere 20 mikrolitrede 1, 5, 10 ve 20 µg BSA ihtiva eden standart solüsyonlar hazırlandı. Hücre ekstraktları ve standart solüsyonların herbirinden 20 µl nitrosellüloz membran (BA - 85, Schleicher ve Schull,

W. Germany) üzerine mikropipet kullanılarak damlatıldı. Oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat proteinlerin kuruması için membran bekletildi. Nitrosellüloz membran 2 defa transfer tamponu ile yıkandı. Transfer tamponu, 192 μM glisin, 25 μM Tris ve % 20 (v/v) metanol karışımından oluştu. 3 defa % 0.5 Tween 20 ihtiva eden PBS ile yıkandı. 10 dakika % 0.1 Amido black ile boyandı. Sık sık değiştirilen % 7 lik glasiyel asetik asit ile yıkandıktan sonra, yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında kurutuldu. Amido black ile boyanan proteinler disk şeklinde nitrosellülozdan kesilerek kapaklıve uygun şişeler içerisine yatay olarak yerleştirildi. Her şişeye 0.5 ml elüsyon solüsyonu (25 mM NaOH, 0.05 mM EDTA, 50 ml etanol ve 50 ml H₂O) ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. Tekrar 0.5 ml elüsyon solüsyonu ilave edilerek 25 dakika çalkalandı. Ekstraktlar ayrı ayrı küvetlere transfer edilerek, absorbands 630 nm de bir Philips spektrofotometrede okundu. Elüsyon solüsyonu blank olarak kullanıldı.

3. 5. Poliakrilamid Gel Elektroforezi ve Eletroforetik Transfer

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970) metoduna göre yapıldı. %5 staking, %10 veya bazı durumlarda %7 resolving gel kullanıldı. Staking gel 50 voltta, resolving gel 100 voltta yürütüldü. Elektroferez geniş bir Shandon aygıtında uygulandı. İzleme boyası olarak bromophenol blue kullanıldı. Bromophenol blue gelin boyuna yaklaşık 2 cm kalan mesafeye ulaştı-

ğında elektroforez durduruldu.

Karbonik anhidraz (29 000), yumurta albumini (45 000), sığır albumini (66 000), fosforilaz B (97 000), B - galaktosidaz (116 000) ve miyosin (205 000) Sigmadan satın alınarak moleküler ağırlık standartları olarak kullanıldı.

Hücre ekstraktları, SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra, elektroforetik olarak nitrosellüloz membrana transfer edildi. Elektroforetik transferin gerçekleştirilmesinde Towbin ve ark.(1979) ve Burnette (1981) metotları kullanıldı. Elektroforetik transfer bir Bio - rad transblot apparatusunda gerçekleştirildi. Ayrıştırılmış hücre ekstraktını ihtiva eden poliakrilamid gel, nitrosellüloz membran ve öteki yardımcı araçlardan kurulan sandöviç , transfer çözeltilisi ihtiva eden transblot tankına yerleştirildi ve yaklaşık 12 saat 80 miliamperde transfer edildi.

3. 6. Glikoproteinlerin Lektinlerle Boyanması

Hücre ekstraktı nitrosellüloz membrana transfer edildikten sonra, 10 dakika PBS ile yıkandı. nitroselüloz membran dilimlere ayrıldı. Moleküler ağırlık standartları ihtiva eden dilim % 0.1 lik Amido black ile 15 dakika boyandı. % 7 glasiyal asetik asit ile yıkandı. Musluk suyu ile de yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutuldu.

Lektinlerle boyanacak olan öteki nitroselüloz dilimleri, lektinin nitroselüloza bağlanmasını önlemek için % 4 lük BSA ile 37 C derecede 1 saat inkübe edildi. Bloke ajanı olarak kullanılmadan önce, BSA'nın lektin bağlayabilecek kısımları bozuldu. Bunun için BSA, PBS içerisinde

çözülerek, 20 mM periodik asit ve 20 mM gliserol ile 4 C derecede 18 saat muamele edildikten sonra, 72 saat PBS e karşı dializ edildi. PBS günlük olarak değiştirildi. Nitroselüloz dilimler BSA ile doyurulduktan sonra 1 defa PBS ile 5 dakika yıkandıktan sonra peroksidaz bağlanmış lektinlerle 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 ve 1 mM MnCl_2 ihtiva eden PBS ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. Herbiri beşer dakika olmak üzere 4 defa PBS ile yıkandı. Lektin lokalizasyonunu görünür hale getirmek için nitroselüloz dilimler 7 dakika karanlıkta boyandı. 5 ml TBS (Tris buffered saline), 1 ml % 0.3 lük 4 - kloro - 1 - naftolun metanoldaki çözeltisi ve 5 μl % 30 luk H_2O_2 in karışımı boyama solüsyonu olarak kullanıldı. Nitroselüloz dilimler musluk suyu ile durulandıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta kurutuldu (Glass ve ark. 1981).

4. DENEY SONUÇLARI

4. 1. Çoğalma Eğrisi

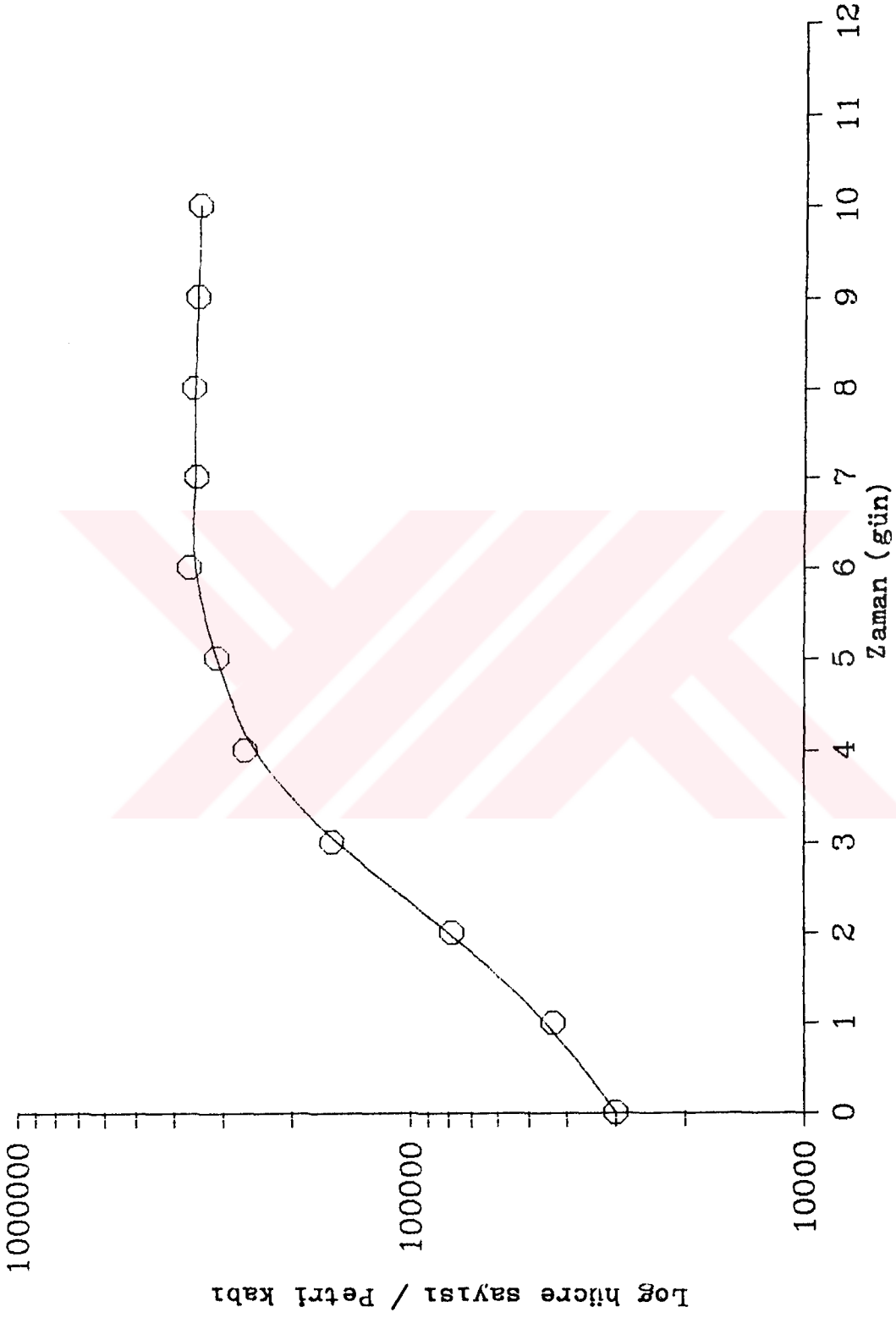
Hücre ekstraktları elde edilmeden önce, hücrelerin logaritmik olarak çoğaldığı ve quiescent dönemde hangi günlerde bulduklarını belirlemek için çoğalma eğrisi oluşturuldu.

Çoğalma eğrisi, aynı zaman ve günde inkübatörden alınarak sayılan, iki Petri kabındaki hücre sayısı ortalamasının log 10 tabanına göre, hücrelerin ekildikten sonraki sayım yapılan zamana karşı işaretlenmesiyle elde edildi (Şek. 1).

Şekilde görüldüğü gibi hücre sayısı hücrelerin ekildikten sonraki ilk 4 gün süresince logaritmik olarak artmaktadır. dördüncü günden sonra bölünme oranı yavaşlamakta, yedinci gün ve sonrasında ise hücre sayısı sabit bir değere ulaşarak değişmemektedir. Başlangıçtan itibaren ilk dört gün süresince bol miktarda gözlenen, parlak ve yuvarlak mitotik hücreler, dördüncü günden sonra az sayıda gözlenmiş ve yedinci günden sonra görülememiştir. Şekil 1 çoğalma eğrisi için yapılan 3 deneyden birinin sonuçlarıdır.

4. 2. Con A Blot Analizi

Logaritmik olarak çoğalan ve quiescent 3T3 fibroblastlarının Con A reaktif glikoproteinlerini karşılaştırmak için, logaritmik olarak çoğalan ve quiescent hücre



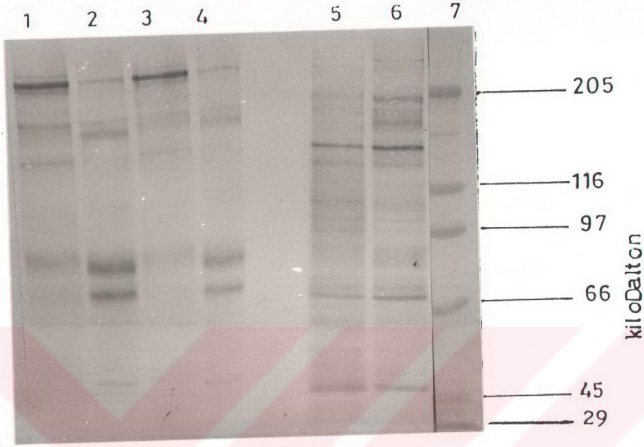
Şek. 1. Swiss faresi 3T3 hücrelerinin çoğalma eğrisi

relerin Triton X - 100 dirençli ekstraktları ile total hücre ekstraktları peroksidaz bağlanmış Con A ile boyandı (Şek. 2). Şekil 2'de görüldüğü gibi Con A, nitroselüloza transfer edilmiş quiescent ve çoğalan durumdaki hücrelerin total ekstraktlarında (Şek. 2, kanal 5, 6) 3 önemli glikoprotein bandını boyadı. Bu bandların molekül ağırlıkları sırası ile yaklaşık 49 - kD, 70 - kD ve 145 - kD'dir. Bu bandların Con A ile boyanma yoğunluğunda, bölünen ve quiescent hücre ekstraktları arasında önemli bir fark gözükmemektedir.

Çoğalan ve quiescent hücrelerin total ekstraktları, aynı hücrelerin Triton X - 100 ekstraktları ile karşılaştırıldığında, total ekstraktların çok daha fazla Con A reaktif band ihtiva ettikleri görülmektedir.

Quiescent hücrelerin Triton X - 100 ekstraktlarında Con A, 220 - kD bandı etken bir şekilde boyadı. Bu ekstraktta 200, 175, 145, 85 ve 70 kD bandlar Con A ile boyandı (Şek.2, kanal 1,3). Logaritmik olarak bölünen hücrelerin Triton X - 100 ekstraktlarında ise 200, 175, 85, 70, 49 ve 220 - kD bandların Con A reaktif olduğu Şekil 2'de (kanal 2,4) görülmektedir.

Quiescent ve bölünen hücrelerin Triton X - 100 ekstraktları, Con A ile boyanma yönünden karşılaştırıldığında 220-kD bandın quiescent hücrelerde, bölünen hücrelere göre çok koyu boyandığı görülmektedir. Quiescent hücrelerin deterjan ekstraktındaki 145-kD band, bölünen hücrelerin deterjan ekstraktında bulunmamaktadır. Çoğalan hücrelerin deterjan ekstraktında dominant Con A reaktif 85 ve 70 kD bandlar, quiescent hücrelerinkinden farklıdır.



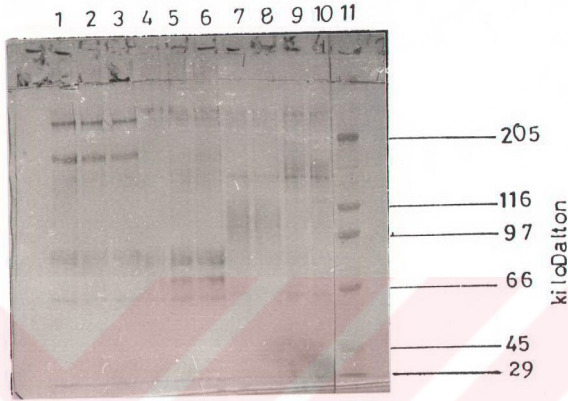
Şekil 2. Hücre ekstraktlarının SDS-PAGE (%7 resolving gel) ile ayrıştırıldıktan sonra nitro-seliüloz membrana transfer edilerek 7 µg/ml peroksidaz bağlı Con-A ile boyanması sonucu elde edilen kromatogramı

- 2, 4: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
 5: quiescent hücrelerin total ekstraktı.
 6: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı.
 7: moleküler ağırlık standartları
 205: miyosin alt ünitesi (tavşan kası)
 116: B - galaktosidaz alt ünitesi (E.coli)
 97: fosforilaz B alt ünitesi (tavşan kası)
 66: albumin (sığır plazma)
 45: yumurta ovalbumini
 29: karbonik anhidraz (sığır eritrositi) ve öncü boya.

4. 3. WGA Boyaması

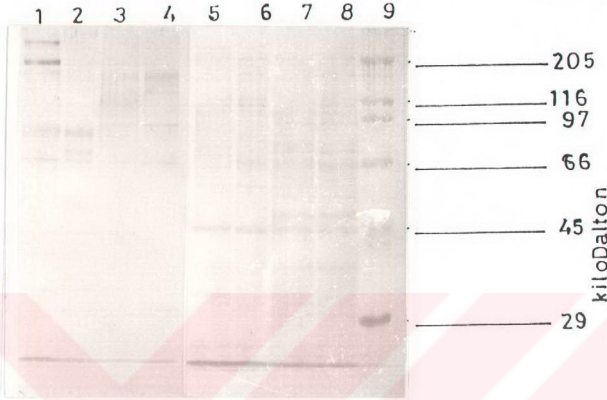
Logaritmik olarak çoğalan ve quiescent durumdaki hücrelerin total ve Triton X - 100 ekstraktları % 7 SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra, nitroselüloz membrana transfer edildi ve 15 µg/ml peroksidaz bağlı WGA ile boyandı (Şek. 3).

Şekil 3'te görüldüğü gibi quiescent hücrelerin deterjan ekstraktlarında, 220 ve 175 - kD molekül ağırlıklı bandlar, bu ekstraktta en önemli ve dikkat çeken WGA reaktif bandlar olarak bulunmaktadır. Quiescent hücrelerin deterjan ekstraktlarında 85 ve 63-kD bandlar WGA ile hafifce boyanmışlardır (Şek. 3, kanal 1,2,3). 63, 70 ve 85-kD bandlar, logaritmik olarak çoğalan hücrelerin deterjan ekstraktlarında, quiescent hücrelerinkine göre daha yoğun boyanmışlardır. Çoğalan hücrelerin deterjan ekstraktlarında bulunan 70-kD WGA reaktif band ise quiescent hücrelerin deterjan ekstraktlarında bulunmamaktadır (Şek.3, kanal 4,5, 6). Çoğalan hücrelerin % 7 SDS-PAGE ile ayrıştırılmış Triton X-100 ekstraktlarında bulunan 70-kD WGA reaktif band, % 10 SDS-PAGE ile ayrıştırılmış deterjan ekstraktlarda da, quiescent hücrelerle karşılaştırıldığında, çoğalan hücrelerin deterjan ekstraktlarında bulunmakta, quiescent hücrelerinkinde bulunmamaktadır (Şek.4, kanal 2). Şekil 3 ve 4'te görüldüğü gibi WGA boyamasının bir özelliği de, öncü boya ile birlikte giden düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerin boyanmasıdır. Her iki durumdaki hücrelerin total ekstraktlarında, önemli WGA reaktif bandlar 145 ve 63-kD'dir. Molekül ağırlığı 90 - 145-kD olan glikoproteinler ise geniş bir bölge olarak boyanmıştır.



Şekil 3. Hücre ekstraktlarının SDS-PAGE (%7 resolving gel) ile ayrıştırıldıktan sonra nitroselüloz membrana transfer edilerek 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peroksidaz başlı WGA ile boyanması sonucu elde edilen kromatogramı

- ekstraktı.
 4,5,6: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
 7,8: quiescent hücrelerin total ekstraktı
 9,10: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı
 11: moleküler ağırlık standartları. Moleküler ağırlık standartları şekil 2'deki standartların aynıdır.



Şekil 4. Hücre ekstraktlarının SDS-PAGE (%10 resolving gel) ile avrıştırıldıktan sonra nitroselüloz membrana transfer edilerek 15 µg/ml peroksidadaz bağlı WGA ile boyanması sonucu elde edilen kromatogramı

- 1: quiescent hücrelerin Triton X-100 ekstraktı
- 2: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı
- 3: quiescent hücrelerin total ekstraktı
- 4: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı
- 5: quiescent hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı
- 6: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı
- 7: quiescent hücrelerin total ekstraktı
- 8: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı
- 9: moleküler ağırlık standartları. Şekil 2' deki standartların aynısı kullanılmıştır. 5, 6, 7, 8 ve 9. kanallar % 0.1 amido black ile boyandı.

4. 4. Lotus tetragonolobus Lektini Boyaması

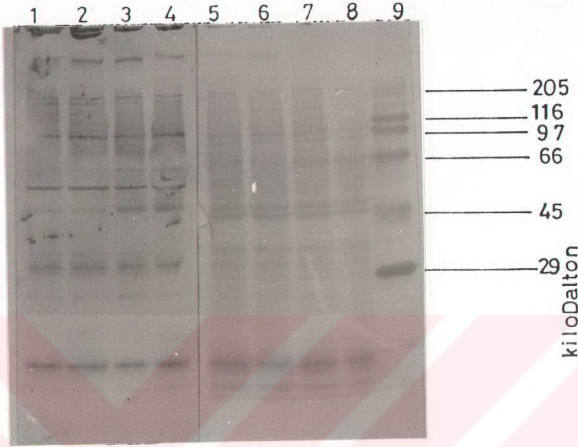
Peroksidaz bağlanmış Lotus tetragonolobus lektini ile boyanan, logaritmik çoğalma ve quiescent durumda bulunan 3T3 fibroblastlarının total ekstraktlarının glikoproteinlerini Şekil 5'de görülmektedir.

Şekilde görüldüğü gibi Lotus tetragonolobus lektini bir çok glikoprotein bandını açığa çıkarmıştır. Bu bandların molekül ağırlıkları yaklaşık 10 000 Dalton'dan 205 000 Daltona kadar değişmektedir. Çoğalan ve quiescent hücrelerin total ekstraktlarının her ikisinde de ortak olarak bulunan ve en göze çarpıcı Lotus tetragonolobus lektini reaktif glikoprotein bandları 10 000 D, 32 000 D, 55 000 D, 105 000 D, 205 000 D ve yaklaşık 220 000 D moleküler ağırlıklı olan bandlardır (Şek. 5, kanal 1,2,3,4).

Logaritmik olarak çoğalan hücrelerle quiescent hücrelerin total ekstraktları arasında Lotus tetragonolobus lektini ile farkedilen, ayırt edici band, moleküler ağırlığı yaklaşık 47 000 Dalton olan bandta görülmektedir. Çoğalan hücre total ekstraktlarında bu band (Şek. 5, kanal 1, 2, 3, 4), quiescent hücrelerinkinden (Şek. 5, kanal 1,2) daha koyu olarak boyanmıştır.

4. 5. Ricinus communis Aglutinini Boyaması

Logaritmik olarak çoğalan ve quiescent hücrelerin total ve Triton X - 100 ekstraktları % 10 SDS - PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra, elektroforetik olarak nitroselüloz



Şekil 5. Hücre ekstraktlarının SDS - PAGE (%10 resolving gel) ile ayrıştırıldıktan sonra nitro - selüloz membrana transfer edilerek 500 µg/ml peroksidaz bağlı Lotus tetragonolobus lektini ile boyanması sonucu elde edilen kromatogramı

1, 2, 5 ve 6. kanallar quiescent hücrelerin total ekstraktı.

3, 4, 7 ve 8. kanallar logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı.

9. moleküler ağırlık standartları. Moleküler ağırlık standartları Şekil 2'dekilerin aynıdır.

5, 6, 7, 8 ve 9. kanallar % 0.1 amido black ile boyandı.

membrana transfer edildi. Ricinus communis aglutinini (RCA 1) reaktif glikoproteinleri ortaya çıkarmak için blot RCA 1 ile boyandı (Şek. 6).

Şekilde görüldüğü gibi Ricinus communis 1 lektininin en önemli özelliği genel olarak yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinleri boyamasıdır.

Logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktında RCA 1, molekül ağırlığı 50-kD ve daha büyük olan çeşitli glikoproteinleri boyamıştır. Bu bandlardan özellikle boyananlar ise molekül ağırlığı 68, 78, 150 ve 205-kD olan bandlardır.

Çoğalan hücrelerin total ekstraktında özellikle boyanan bandlar, quiescent hücrelerin total ekstraktında da boyanmışlardır fakat koyulukları daha zayıftır.

68 - kD, 78 - kD ve 205 - kD bandlar, çoğalan ve quiescent durumdaki hücrelerin Triton X - 100 ekstraktlarında da RCA 1 ile reaksiyon vermişler, fakat boyanma koyulukları bakımından farklılık göstermektedirler (Şek. 6, kanal 1, 2).

Quiescent hücrelerin Triton X - 100 ekstraktında molekül ağırlığı 205 - kD olan band, daha büyük molekül ağırlıklı fibronektinle birlikte geniş bir yığın şeklinde RCA 1 ile koyuca boyanmıştır.

Molekül ağırlığı yaklaşık 68 - kD olan band ise her iki durumdaki hücrelerin Triton X - 100 ekstraktlarında çift olarak bulunmakta ve çoğalan hücrelerle karşılaştırıldığında, quiescent hücrelerde bulunmamaktadır.



Şekil 6. Hücre ekstraktlarının SDS-PAGE (%10 resolving gel) ile ayrıştırıldıktan sonra nitroselüloz membrana transfer edilerek 200 µg/ml peroksidaz bağılı Ricinus communis aglutinini ile boyanması sonucu elde edilen kromatogramı

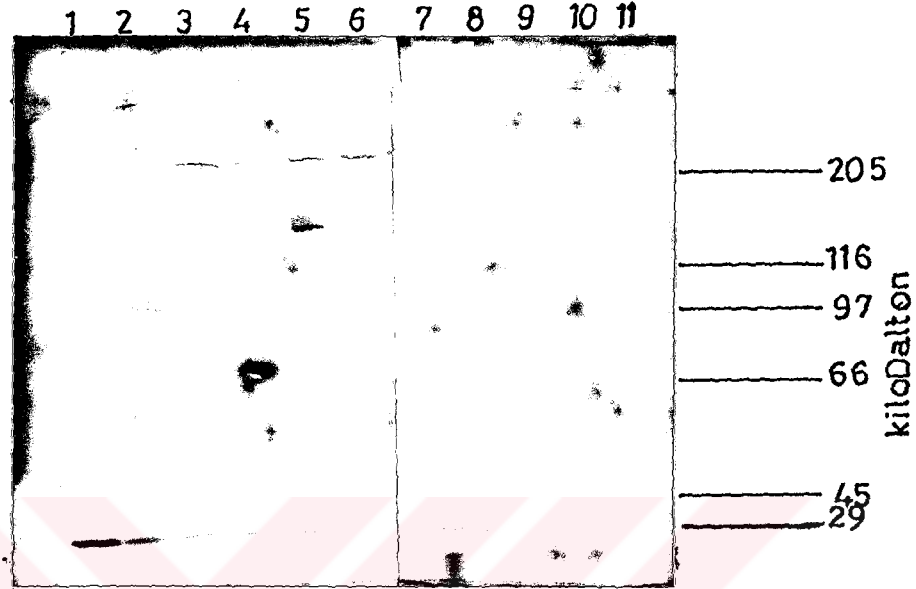
- 1: quiescent hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
 - 2: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
 - 3: quiescent hücrelerin total ekstraktı.
 - 4: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı.
 - 5: quiescent hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
 - 6: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
 - 7: quiescent hücrelerin total ekstraktı.
 - 8: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı.
 - 9: moleküler ağırlık standartları. Standartlar Şekil 2'deki standartların aynısıdır.
- 5, 6, 7, 8 ve 9. kanallar % 0.1 amido black ile boyandı.

4. 6. Ulex europaeus Aglutinini Boyaması

Ulex europaeus 1 aglutinini (UEA 1) ile boyanmış, çoğalan ve quiescent hücrelerin total ve Triton X - 100 ekstraktlarını ihtiva eden blot Şekil 7'de görülmektedir.

Şekil 7'de görüldüğü gibi Ulex europaeus 1 lek - tini değişik molekül ağırlıklı glikoprotein bandlarını boyamıştır. Boyanan bu bandlardan en göze çarpanı, molekül ağırlığı yaklaşık 220 - kD olan glikoprotein bandıdır. 220 - kD glikoprotein bandı, çoğalan ve quiescent hücrelerin total ekstraktlarında dikkat çekici olmasına karşın hücrelerin Triton X - 100 ekstraktlarında bulunmamaktadır.

Molekül ağırlığı yaklaşık 170 - kD, 110 - kD, 105 kD, 66 - kD ve 55 - kD olan glikoproteinler hücrelerin total ve Triton X - 100 ekstraktlarında boyanmışlardır. 47 kD glikoprotein hücrelerin total ekstraktlarında hafifce boyanmasına karşın, Triton X - 100 ekstraktlarında bulunmamaktadır. Ulex europaeus 1 aglutinini öncü boya ile birlikte bulunan ve tam olarak ayrıştırılamamış düşük moleküler ağırlıklı glikoproteinleri de yoğun olarak boyamaktadır.



Şekil 7. Hücre ekstraktlarının SDS-PAGE (%7 resolving gel) ile ayrıştırıldıktan sonra nitroselüloz membrana transfer edilerek 300 µg/ml peroksidaz bağlı *Ulex europaeus* I aglutinini ile boyanması sonucu elde edilen kromatogramı

- 1, 7: quiescent hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
- 2, 8: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktı.
- 3, 4, 9: quiescent hücrelerin total ekstraktı.
- 5, 6, 10: logaritmik olarak çoğalan hücrelerin total ekstraktı.
- 11: moleküler ağırlık standartları. Şekil 2'deki moleküler ağırlık standartlarının aynı- sı kullanılmıştır. 7 - 11 kanallar % 0.1 amido black ile boyandı.

5. TARTIŞMA

Elektroforetik olarak ayrıştırılmış glikoproteinleri, lektin kullanarak tesbit etmek amacı ile çeşitli teknikler kullanılmıştır. Glikoproteinleri doğrudan gel üzerinde tesbit etmek için Burrige (1976) ¹²⁵I ile işaretlenmiş lektin, McIntyre ve ark. (1979) ³H ile işaretlenmiş lektin kullanmışlardır. Hücre ekstraktları elektroforetik olarak ayrıştırıldıktan sonra, nitroselüloz membrana transfer edilerek Glass ve ark. (1981) anti-lektin anti-serum kullanarak, immunolojik olarak glikoproteinleri tesbit etmişlerdir.

Bu çalışmada, nitroselüloz membrana transfer edilmiş glikoproteinleri boyamak için peroksidaz ile işaretlenmiş lektinler kullanıldı. Peroksidaz ile işaretlenmiş lektinle boyama metodunun, ¹²⁵I ile işaretlenmiş lektin ve anti-lektin antiserum teknikleri kadar duyarlı olduğu, ³H ile işaretlenmiş lektin tekniğinden ise daha hassas olduğu işaret edildi (Goldstein 1976). Ayrıca peroksidaz metodunun PAS (periodik asit- Schiff) tekniğinden daha duyarlı olduğu, daha çabuk sonuca ulaşma ve düşük maliyet avantajlarının da olduğu rapor edilmiştir (Ramirez ve ark. 1983). Peroksidaz metodunun duyarlılığını belirlemek için yapılan çalışmada, 1 µg/ml tiroglobülinin farkedilebildiği kaydedilmiştir (Hawkes ve ark. 1982).

Esas deneylere başlamadan önce bazı ön denemelerle lektinlerin optimum bağlanma şartları belirlendi. Lektinlerin spesifik olmayarak nitroselüloz membrana bağlanmasını önlemek için, nitroselülozun lektin bağlayabi-

lecek grupları bloke edildi. Bu amaçla FCS, jelatin, yağsız süt tozu (Marvel) ve BSA kullanıldı. Bloke edici ajanların % 3'lük solüsyonları PBS ile hazırlanarak, nitroselüloz membranın doyurulmasında kullanıldı. FCS ve jelatin nitroselülozla kuvvetli reaksiyon verdi. BSA ve yağsız süt tozu, nitroselüloz membran ile FCA ve jelatinden daha az ve birbirine benzer şiddette reaksiyon verdi. Ticari olarak bulunan BSA'nın % 99 saflıkta olması ve lektin bağlayan gruplar ihtiva etmesinden dolayı, periodik asit ile muamele edildi (Glass ve ark. 1981) ve bloke ajanı olarak deneylerde kullanıldı.

Çalışmada peroksidaz ile işaretlenmiş, farklı karbohidratlara özgü lektinler kullanıldı. Peroksidazın nitroselüloza transfer edilmiş hücre ekstraktlarına bağlanabileceği ihtimali dikkate alındı. Bu ihtimali gerçekleştirmek için hücre ekstraktlarını ihtiva eden nitroselüloz membran üzerindeki glikoproteinler, peroksidaz ile işaretlenmiş lektinlerle boyama metodu kullanılarak, sadece peroksidaz ile boyanmış ve sonuçta herhangi bir spesifik boyanma gözlenmemiştir.

Lektinlerin glikoproteinlere bağlanmasının sıcaklığa bağlı olduğu Lotan ve ark.(1977), Huet(1975), Brattain ve ark. (1977) tarafından rapor edildi. Esas deneylerin yapılacağı optimum sıcaklığı ve kullanılacak optimum lektin konsantrasyonunu belirlemek için ön denemeler yapıldı. 4 C derecede ve oda sıcaklığında, değişik lektin konsantrasyonları ile yapılan bu ön denemeler, oda sıcaklığının çalışmada kullanılan lektinler için optimum olduğunu gös -

termiştir. Optimum lektin konsantrasyonları, çalışmada kullanılan her lektin için şekillerin altında belirtilmiştir.

Çoğalan ve quiescent durumdaki hücrelerin iyonik olmayan deterjan Triton X - 100 ekstraksiyonu sonucu, deterjan - dirençli materyalde, total hücre ekstraktları ile karşılaştırıldığında, lektinler tarafından farkedilen glikoprotein bandı sayısında bir azalma görülmektedir. Bu azalma daha önce yapılan benzer çalışmaların sonuçları ile uyum içerisindedir. Tarone ve ark. (1984) konfluent BHK hücreleri ile yaptıkları çalışmada, Triton X - 100 ekstraktının, total hücre ekstraktının yaklaşık % 20'sini teşkil ettiğini, Lehto (1983) konfluent insan embriyo fibroblastlarının, total hücre proteinlerinin yaklaşık % 30'unu ihtiva ettiğini belirtmişlerdir. Lehto çalışmasında total hücre ekstraktında 20'den fazla polipeptid bandının bulunmasına karşın, Triton X - 100 dirençli ekstraktta 2 önemli polipeptid bandı tesbit edebilmişlerdir. İyonik olmayan deterjan - dirençli hücre materyali hücre iskeleti ile çekirdekte oluşur (Osborn ve Weber 1977).

220 - kD glikoprotein, bu çalışmada kullanılan bütün lektinler tarafından boyanmıştır. Özellikle quiescent hücrelerin Triton X - 100 dirençli ekstraktlarında, 220 - kD glikoprotein bandı dominant olarak bulunmakta, Con A ve WGA ile koyu olarak boyanmıştır. Fibronektin olarak isimlendirilen bu glikoprotein, sadece konfluent hücre kültürlerinde ve bu kültürlerin iyonik olmayan deterjan ekstraktlarında bol miktarda bulunan, temel bir glikoprotein olduğu, konfluent BHK ve insan embriyo fibroblastları

ile yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (Lehto 1983, Tarone ve ark. 1984). Ancak bu araştırmacılar fibronektini lektinlerle boyamamışlardır. Bu çalışmada kullanılan lektinler, çoğalan hücre ekstraktlarında fibronektini hafifce boyamışlardır.

Quiescent hücrelerin Triton X - 100 dirençli ekstraktlarında, molekül ağırlığı 145 - kD olarak hesaplanan glikoprotein Con A ile boyanmıştır (Şek. 2). Fibronektine ilave olarak, konfluent insan fibroblastlarının iyonik olmayan deterjan dirençli materyalinde, molekül ağırlığı 140 kD olan bir protein, hücre yüzeyi glikoproteini olarak tanımlanmıştır. Tripsin ve kimotripsin gibi enzimlere karşı dirençli olan 140 - kD protein, sialik asit ve fukoz ihtiva eder. Transmembran glikoproteini olarak, hücre iskeleti ile perinükleer matrix arası organizasyonda rol oynar (Lehto 1983).

Glass ve ark. (1981) normal rat karaciğer, Novikoff hepatoma ve rat meme tümörü hücreleri ile yaptıkları çalışmada, bu hücrelerin Triton X - 100 ile muamele edilmiş çekirdeklerinde, 65 - kD glikoproteininin WGA reaktif, 200 - kD glikoproteininin ise Con A reaktif olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da aynı bölgelerde Con A ve WGA ile boyanan glikoprotein bantları bulunmaktadır.

Bu çalışmada hem çoğalan hem de quiescent hücrelerin total ekstraktlarında, birçok glikoprotein bandı Con A ile boyanmıştır. Bu bantların en göze çarpanları, her iki total ekstraktta da ortak olup 49 - kD, 70 - kD ve 145 kD molekül ağırlıklı olanlardır.

Bernard ve ark. (1982) civciv embriyo fibroblastlarının Con A bağlayan sayısız glikoproteine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kan pulcukları (platelet) ekstraktı SDS - PAGE ile ayrıştırılıp, nitroselüloza transfer edildikten sonra yapılan Con A boyaması ile molekül ağırlığı 50 - 70 - kD arasındaki glikoproteinlerin boyandığı belirtilmiştir (Moroi ve Jung 1984). Codogno ve ark. (1988) subkonfluent civciv embriyo fibroblastları ekstraktını Con A ile boyamışlar, molekül ağırlığı 30 - kD ile 72 - kD arasında olan glikoproteinlerin Con A'ya bağlandığını rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar 72 - kD glikoproteini, hücre yüzeyi Con A bağlayıcı olarak tanımlamışlardır. Daha sonra 72 - kD glikoprotein, fibroblastların laminin üzerinde yayılması ile ilgili olduğu belirlendi (Moutsita ve ark. 1991).

Bu çalışmada, çoğalan hücrelerin deterjan dirençli ekstraktlarında, quiescent hücreleriyle karşılaştırıldığında daha yoğun olarak bulunan ve 70 - kD hesaplanan band, muhtemelen Codogno ve arkadaşları ile Moutsita ve arkadaşlarının belirttiği banddır.

Hücrelerin Triton X - 100 ekstraktlarında, Con A reaktif bandlar, çoğalan ve quiescent hücrelerde farklılık göstermektedir. Quiescent hücrelerin deterjana dirençli ekstraktlarında en önemli ve dikkat çekici band, molekül ağırlığı yaklaşık 220 - kD olan banddır. Bu band çoğalan hücrelerin deterjana dirençli ekstraktlarında, quiescent hücrelerinki ile karşılaştırıldığında çok zayıf kalmaktadır (Lehto 1983 , Tarone ve ark. 1984). Molekül

ağırlığı yaklaşık 200 - kD ve 175 - kD olarak hesaplanan deterjana dirençli, Con A reaktif bandlar her iki durum - daki hücre ekstraktında da bulunmaktadır. Quiescent hücrelerin deterjana dirençli ekstraktlarında bulunan 145 - kD Con A reaktif band, çoğalan hücrelerin deterjan ekstraktlarında bulunmamaktadır. Molekül ağırlığı yaklaşık 85 - kD ve 70 - kD hesaplanan bandlar ise çoğalan hücrelerin deterjan ekstraktlarında, quiescent hücrelerdekine göre daha koyudur. 49 - kD Con A reaktif band, quiescent hücrelerin deterjana dirençli ekstraktlarında bulunmamaktadır.

Tarone ve ark. (1984) konfluent BHK hücrelerinde gp85 olarak isimlendirilen ve Triton X - 100 dirençli bir glikoproteini, hücre iskeliti ile ilgili olarak tanımladılar. Araştırmacılar gp85'in başka memeli hücrelerinde de bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada Con A, 85 - kD glikoproteini quiescent hücrelerdekinden daha koyu olarak çoğalan hücre ekstraktlarında boyamıştır.

Bu çalışmada, her iki durumdaki hücrelerin total ekstraktlarında WGA reaktif en önemli bandlar, 145 ve 63 - kD olanlardır. Molekül ağırlığı 90- 145 - kD olan glikoproteinler ise geniş bir bölge olarak boyanmışlardır. Bu sonuçlar daha önce yapılan benzer çalışmalar ile de desteklenmektedir. Konfluent Swiss 3T3 fibroblastları plazma membranı ile yapılan çalışmada, molekül ağırlığı 115 - 150 kD glikoprotein bandlarının WGA ile boyandığı ve fibronektinle ilişki kurduğu (Urushihara ve Yamada 1986), molekül ağırlığı 100 - kD ile 140 - kD arasındaki bandların WGA ile tek bir band olarak boyandığı (Burridge 1976) belirtilmiştir.

Ricinus communis aglutinini 120 - kD ağırlığında, tetramer yapıda, kuvvetli bir toksin ve eritroaglutinindir. pH değişikliğine, proteolizislere ve tekrarlanan dondurma ve çözme olaylarına dayanıklıdır (Olsnes ve ark. 1974). Bu lektin tercihen B - D galaktositlerle etkileşir. Bu nedenle Con A gibi geniş spektrumlu lektinlerden çok daha seçicidir ve daha az glikoproteine bağlanır (Debray ve ark. 1981, Kaifu ve Osawa 1976).

İnsan derisi fibroblastları total ekstraktı ile yapılan benzer bir çalışmada Gordon ve Pena (1982) 220 - kD molekül ağırlığındaki glikoprotein Ricinus communis aglutinini ile boyandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada fare 3T3 fibroblastları total ve deterjan ekstraktlarında 220 - kD ağırlığındaki glikoprotein, aynı lektin ile boyanmıştır. Özellikle quiescent hücrelerin deterjan ekstraktlarında fibronektinin bulunduğu bölge çok koyu olarak boyanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 150 - kD olan glikoproteinden fibronektinin bulunduğu bölgeye kadar olan bölge, quiescent hücrelerin deterjan ekstraktlarında, diğer hücre ekstraktlarından ayırt edici olarak boyanmıştır. Bu sonuç Nicolson ve Lacorbriere (1973) tarafından yapılan aglutinasyon çalışmaları ile de desteklenmektedir. Araştırmacılar, konfluent hücrelerin çoğalan hücrelerden 2,5 defa daha fazla Ricinus communis aglutinini bağladıklarını kaydetmişlerdir. 220 - kD glikoprotein civciv embriyo fibroblastlarının başlıca Ricinus communis aglutinini bağlayan glikoproteini olarak bildirilmiştir (Burrige 1976).

İnsan derisi fibroblastlarının total ve Triton X

100 ekstraktlarında 140 - kD glikoprotein Ricinus communis aglutinini reaktif olarak kaydedilmiştir (Gordon ve Pena 1982). Bu glikoprotein muhtemelen bu çalışmada 150 - kD olarak belirtilen glikoproteindir.

Bu çalışmada, molekül ağırlığı yaklaşık 78 - kD olan glikoprotein, konfluent ve çoğalan hücrelerin Triton X - 100 ekstraktlarında başlıca Ricinus communis aglutinini bağlayan glikoprotein bandı, molekül ağırlığı 68 - kD olan bandın ise çoğalan hücrelerin total ve deterjan ekstraktlarında dominant olarak bulunduğu tesbit edilmiştir. 68 - kD band, konfluent hücrelerin total ekstraktında Ricinus communis aglutinini reaktivitesi yönünden önemli derecede azalma göstermekte, bu hücrelerin deterjan ekstraktında ise bulunmamaktadır.

Lotus tetragonolobus ve Ulex europeus lektinlerinin ikisinin de terminal L - fukoz bağlamasına karşın fukozun kurduğu bağ durumuna göre birbirlerinden farklılık gösterirler (Kabat ve Pereira 1974, Pereira ve ark. 1978, Vitale ve Krusius 1982). Her iki fukoz bağlayan lektin, quiescent ve çoğalan hücrelerin total ekstraktlarında birçok glikoprotein bandını boyamışlardır. Lotus tetragonolobus lektini ile boyanan en önemli bandlar, 220 - kD, 205 - kD, 105 kD, 55 - kD, 32 - kD ve molekül ağırlığı yaklaşık 10 - kD olan glikoproteinlerdir. Quiescent ve çoğalan durumdaki hücrelerde, boyanma farkı gösteren tek band 47 - kD'dir. Bu band çoğalan hücrelerde daha koyudur.

Ulex europaeus lektini çoğalan ve quiescent durumdaki hücreler arasında, L - fukoz ihtiva eden glikopro-

teinler açısından herhangi bir farklılık göstermemiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık 220 - kD, 170 - kD, 110 - kD, 105 - kD, 66 - kD, 55 - kD ve 47 - kD bandlar, Ulex europaeus lektini ile boyanan başlıca bandlardır. Bu lektin hücrelerin deterjan ekstraktlarında 220 - kD glikoprotein bandını boyamamıştır.

Gordon ve Pena (1982) insan derisi fibroblastları ile yaptıkları benzer çalışmada, Ulex europaeus lektini ile önemli hiç bir glikoprotein bandının boyanmadığını belirtmişlerdir. Gordon ve Pena çalışmalarında 10 µg/ml lektin kullanmışlardır. Ulex europaeus lektini için Gordon ve Pena tarafından kullanılan konsantrasyonun yetersizliği, lektin konsantrasyonlarını optimize etmek için yapılan ödenemeler sırasında, tarafımızdan da gözlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Baserga, R. (1985) The biology of cell reproduction. Harvard University Press. Cambridge.
- Bernard, B., Font, G., Aubrey, M. & Bourillon, R. (1982) Influence of temperature on the interaction of concanavalin A with chick fibroblasts during embryo development. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 106, 254-64.
- Brattain, M.G. Kimball, P.M., Pretlow, T-G. and Marks, M.E. (1977) The interaction of N-Acetylhexosaminidase with insolubilized Con-A. *Biochem. J.*, 163, 247-51.
- Buck, C.A., Glick, M.G. & Warren, L. (1971) Effect of growth on the glycoproteins from the surfaces of control and Rous sarcoma virus transformed transmitter cells. *Biochim.*, 10, 2176-2180.
- Burger, M.M. (1969) A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62, 994-1001.
- Burger, M.M. & Goldberg, A.R. (1967) Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57, 359-366.
- Burnette, W.N. (1981) "Western Blotting" Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins-A. *Analytical Biochemistry*, 112, 195-203.
- Burridge, K. (1976) Changes in cellular glycoproteins after transformation; identification of specific glycoproteins and antigens in sodium dodecyl sulphate gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4457-4461.
- Chrispeels, M.J. & Raikhel, N.V. (1991) Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3, 1-9.
- Chu, F.K., Trimble, R.B. & Moley, F. (1978) The effect of carbohydrate depletion on the properties of yeast external invertase. *J. Biol. Chem.*, 253, 8691-8693.
- Codogno, P. Moyne, M.A.D., Botti, J. & Aubrey, M. (1988) concanavalin-A-induced impairment of fibroblast spreading on laminin but not on fibronectin. *Journal of Cellular Physiology*, 136, 463-470.

- Croy, R. and Pardee, A.B. (1983) Enhanced synthesis and stabilization of MW.68000 protein in transformed Balb c/3T3 cells; candidate for restriction point control. Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 80, 4699-4703.
- De Asua, L.J., O'Farrel, M.K., Clingan, D. & Rutland, P.S. (1997) Temporal sequence of hormonal interactions during the prereplicative phase of quiescent cultured 3T3 fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3845-3849.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. and Motreuil, J. (1981) Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-Glycosylproteins. Eur. J. Biochem., 117, 41-55.
- Denhart, D.T., Edwards, D.R. & Parfett, C.L.J. (1986) Gene expression during the mammalian cell cycle. Biochim. Biophys. Acta, 862, 83.
- Dennis, J.W. (1985) Partial reversion of the metastatic phenotype in a wheat germ agglutinin-resistant mutant of the murine tumour cell line MDAY-D2 selected with Bandeiraea simplicifolia seed lectins. J.N.C.I., 74, 1111-1120.
- Dixon, H.B.F. (1981) Defining a lectin. Nature, 292, 192.
- Duksin, D. & Bornstein, P. (1977) Changes in surface properties of normal and transformed cells caused by tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3433-3437.
- Dulaney, J.T. (1979) Binding interaction of glycoproteins with lectins. Molecular and Cellular Biochemistry, 21, 43-63.
- Etzler, M.E. (1986) Distribution and functions of plant lectins. In "The Lectins" [Ed. Liener, I.E., Sharon, N. & Goldstein, I.J.] San Diego Academic Press, pp 331-435.
- Finne, J., Burger, M.M. & Prieels, J.P. (1982) Enzymatic basis for a lectin-resistant phenotype : increase in a fucosyltransferase in mouse melanoma cells. J. Cell Biol., 92, 277-82.
- Finne, J., Tao, T.W. & Burger, M.M. (1980) Carbohydrate changes in glycoproteins of a poorly metastasizing wheat germ agglutinin-resistant melanoma clone. Cancer Research, 40, 2580-87.
- Fountain, D.W., Foard, D.E., Repigle, W.D. & Yang, W.K. (1977) Lectin release by soybean seeds. Science, 175, 1185-1187.

- Fox, T.O., Sheppard, J.R. & Burger, M.M. (1971) Cyclic membrane changes in animal cells : transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis. Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 244-247.
- Fujita-Yamaguchi, Y., Choi, S., Sakamoto, Y. & Itakura, K. (1983) Purification of insulin receptor with full binding activity. J. Biol. Chem., 258, 5045-5049.
- Furlan, M., Perret, B.A. & Beck, E.A. (1979) Staining of glycoproteins in polyacrylamide and agarose gels with fluorescent lectins. Anal. Biochem., 96, 208-214.
- Gatehouse, A.M.R., Dewey, F.M., Dove, J. Fenton, K.A. & Pusztai, A. (1984) Effect of seed lectins from Phaseolus vulgaris on the development of larvae of Callosobruchus maculatus mechanism of toxicity. J. Sci. Food Agric., 35, 373-380.
- Glass, W.F., Briggs, R.C. & Hnilica, L.S. (1981) Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. Anal. Biochem., 115, 219-224.
- Glick, M.C., Comstock, C. & Warren, L. (1970) Membranes of animal cells. Biochem. Biophys. Acta, 219, 290-300.
- Goldstein, I.J. (1976) Using concanavalin-A as a tool. [Ed. Bittiger, H. & Schnebli, H.P.] Wiley-Interscience, New York, pp 57-65.
- Goldstein, I.J. Hughes, R. C., Monsiny, M., Osawa, T., and Sharon, N. (1980). What should be called a lectin ? Nature, 285, 66.
- Gordon, B.B. and Pena, S.D.J. (1982) The surface glycoproteins of human skin fibroblasts detected after electrophoresis by the binding of peanut (Arachis hypogaea) agglutinin and Ricinus communis (castor-bean) agglutinin 1. Biochem.J., 208, 351-358.
- Hawkes, R., Niday, E. & Gordon, J. (1982) A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem., 199, 142-147.
- Hickman, S. & Kulczckii, A. & Kornfield, S. (1977) Studies of the mechanism of tunicamycin inhibition of IgA and IgE secretion by plasma cells. J. Biol. Chem., 252, 4402.

- Huet, M. (1975) Factors affecting the molecular structure and agglutination ability of concanavalin-A and other lectins. *Eur. J. Biochem.*, 59, 627-32.
- Inbar, M. & Sachs, L. (1969) Interaction of the carbohydrate-binding proteins concanavalin-A with normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, 1418-1425.
- Iwase, H., Kato, Y. & Hotta, K. (1981) Ovalbumin subfractionation and individual difference in ovalbumin microheterogeneity. *J. Biol. Chem.*, 256, 5638-42.
- Jansen, D.H., Juster, H.B. & Liener, I.E. (1976) Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science*, 192, 795-96.
- Kabat, E. A. and Pereira, M.E.A. (1974) Specificity of purified hemagglutinin(lectin) from Lotus tetragonolobus. *Biochemistry*, 13, (15), 3184-3194.
- Kaifu, R. and Osowa, T. (1976) Synthesis of O-B-D galactopyranosyl-(1-4)-o-(2-acetamido-2-deoxy-B-D-glucopyranosyl)-(1-2)D-mannose and its interaction with various lectins. *Carbohydrate Research*, 52, 179-185.
- Kocourek, I. (1986) In *The Lectins* [Ed. Liener, I.E., Sharon, N. & Goldstein, I.J.] Academic Press Inc., pp 1-32.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lehto, V.P. (1983) 140.000 Dalton surface glycoprotein; a plasma membrane component of the detergent-resistant cytoskeletal preparations of cultured human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 143, 271-286.
- Lis, H. & Sharon, N. (1986) In *"The Lectins"* [Ed. Liener, I.E., Sharon, N. & Goldstein, I.J.] Academic Press Inc., pp 293-370.
- Lodish, H.F. & Kong, N. (1984) Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secrets. *J. Cell Biol.*, 98, 1720-1729.
- Lotan, R., Beattie, G., Hubbell, W., and Nicolson, G.L. (1977) Activities of lectins and their immobilized derivatives in detergent solution. *Biochem.*, 16, 1797-1794.

- Mathews, J.W., Bernstein, R.B., Franza, B.R. & Garrels, J.I. (1984) Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 309, 374-376.
- McIntyre, L.J., Quailes, R.H. & Brady, R.O. (1979) Lectin-binding proteins in central-nervous-system myelin. *Biochem. J.*, 183, 205-212.
- Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N. & Lotan, R. (1975) Inhibitions of fungal growth by wheat germ agglutinins. *Nature*, 256, 414-416.
- Montreuil, J. (1980) Primary structure of Glycoprotein Glycans Basis for the Molecular Biology of Glycoproteins. *Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 37, 157-223.
- Moroi, M. & Jung, S.M. (1984) Selective staining of human platelet glycoproteins using nitrocellulose transfer of electrophoresed proteins and peroxidase-conjugated lectins. *Biochemica et Biophysica Acta*, 798, 295-301.
- Moutsita, R., Aubrey, M. & Codogno, P. (1991) A Mr.72K cell surface concanavalin-A binding glycoproteins is ecifically involved in spreading of chick embryo fibroblasts onto laminin substrate. *Exp. Cell Res.* 192, 236-242.
- Nicolson, G.L. and Lacorbiere, M. (1973) Cell contact-dependent increase in membrane D-Galactopyranosyl-Like Residues on Normal, But Not Virus - or Spontaneously - Transformed Murine Fibroblast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70 (6), 1672-1676.
- Nomenclature Committee Archs. (1981) *European Journal of Biochemistry*, 114, 1-4.
- Olden, K., Parent, B. & White, S.L. (1982) Carbohydrate moieties of glycoproteins a re-evaluation of their function. *Biochemica et Biophysica Acta*, 650, 209-232.
- Olden, K., Pratt, R.M. & Yamada, K.M. (1978) Role of carbohydrate in protein secretion and turnover : effect of tunicamycin on major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts. *Cell*, 13, 461-473.
- Olsnes, S., Saltvedt, E. and Phil, A. (1974) Isolation and comparison of galactose-binding lectins from Abrus precatorius and Ricinus communis. *J. Biol. Chem.*, 249, 803.
- Osborn, M. and Weber, K. (1977) The detergent resistant cytoskeleton of tissue culture cells includes the

nucleus and the microfilament bundles. *Exp. Cell Res.*, 106, 339-349.

- Pereira, M.E.A., Kisailus, E.C., Gruezo, F. and Kabat, E.A. (1978) Immunochemical studies on the combining site of the blood group H-specific lectin 1 from *Ulex europeus* seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 185 (1), 108-115.
- Ramirez, P., Bonilla, J.A., Moreno, E. & Leon, P. (1983) Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detections with peroxide-bound lectin and protein-A. *J. of Immunobiological Methods*, 62, 15-22.
- Reisner, V., Sharon, N & Haran-Ghera, N. (1980) Expression of peanut agglutinin receptors on virus-induced preleukemic cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2244-2246.
- Riddle, V.G.H., Dubrow, R. and Pardee, A.B. (1979) Changes in the synthesis of actins and other cell proteins after stimulation of serum-arrested cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1298-1302.
- Rollins, B.J. and Stiles, C.D. (1989) Serum-inducible genes. *Advances in Cancer Research*, 53, 1-31.
- Schaffner, W. & Weissmann, C. (1973) A rapid sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.*, 56, 502-514.
- Schwarz, R.T. and Datema, R. (1984) Inhibitors of trimmings new tools in glycoprotein research. *TIBS-January*, 32-34.
- Shibata, S., Peters, B.P., Roberts, D.D., Goldstein, I. and Liotta, L.A. (1982) Isolation of laminin by affinity chromatography on immobilised *Griffonia simplicifolia* 1 lectin. *F.E.B.S. Letters*, 142, 194-198.
- Smets, L.A. & De Ley, L. (1974) Cell cycle dependant modulations of the surface membrane of normal and SV40 virus transformed cells. *J. Cell Physiol.*, 84, 343-348.
- Stanley, P. (1980) In "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" [Ed. Lennarz, W.I.] Plenum, New York, 161-189.
- Tao, T.W. & Burger, M.M. (1982) Lectin-resistant variants of mouse melanoma cells. *Int. J. Cancer*, 24, 425-430.
- Tarone, G., Ferracini, R., Geletto, G. & Comoglio, P. (1984) A cell surface integral membrane

glycoprotein of 85.000 mol-wt (gp85) associated with Triton X-100-insoluble cell skeleton. J. Cell Biol., 99, 512-519.

Todaro, G.J. & Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell. Biol., 17, 299-313.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-54.

Urushiara, H. and Yamada, K.M. (1986) Evidence for involvement of more than one class of glycoproteins in cell interactions with fibronectin. J. Cellular Physiology, 126, 323-332.

Verma, R., Lide, H. & Pardee, A.B. (1988) Modulation of expression of the stress-inducible p118 of Saccharomyces cerevisiae by cAMP J. Biol. Chem., 263, 8576-8582.

Vitale, J. and Krusius, T. (1982) Blood group A and H determinants in polyglycosyl peptides of A1 and A2 erythrocytes. Eur. J. Biochem., 126, 401-406.

Wang, E. (1985) A 57.000 mol-wt protein unique present in nonproliferating cells and senescent human fibroblasts. J. Cell Biol., 100, 545-551.

Wang, E. & Lin, S.L. (1986) Disappearance of statin, a protein marker for non-proliferating and senescent cells, following serum-stimulated cell cycle entry. Exp. Cell Res., 167, 135-143.

Wu, H.C., Meezan, E., Black, P.H. & Robbins, P.W. (1969) Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane component of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. Glucosamine-labeling pattern in 3T3 cells. Biochem., 8, 2509-2517.

Zhu, B.C.R., Fisher, S.F., Pande, H., Calaycay, J., Shively, J.E. & Laine, R.A. (1984) Humans placental (fetal) fibronectin: increased glycosylation and higher protease resistance than plasma fibronectin. J. Biol. Chem., 259, 3962-3970.